

Aus der Universitätskinderklinik in Marburg

Direktor: Prof.Dr.med. F.Linneweh

Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Aktivitäten
der Erythrozyten in verschiedenen Lebensaltern auf
der Grundlage eines verbesserten Enzymtests.

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

Vorgelegt von
Gisela Stümpel
aus Dortmund

Marburg 1972



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553806_0012

Aus der Universitätskinderklinik in Marburg

Direktor: Prof.Dr.med. F.Linneweh

Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Aktivitäten
der Erythrozyten in verschiedenen Lebensaltern auf
der Grundlage eines verbesserten Enzymtests.



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

Vorgelegt von

Gisela Stümpel

aus Dortmund

Marburg 1972



Angenommen von der Medizinischen Fakultät der
Universität Marburg am

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof.Dr. Oepen

Referent: Prof.Dr. W.Barthelmai

Correferent: Prof.Dr. K.Müller

Inhaltsübersicht

	Seite
I Einleitung	3
II Galaktosestoffwechsel	4
III Galaktosämie	6
IV Galaktokinasemangel	9
V Bisherige Methoden zur Bestimmung der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase	10
1.) Galaktose-Toleranztest	10
2.) Radioisotopen-Methoden	10
3.) UDPG-Konsumptionstest	11
4.) Methylenblau-Test	12
5.) Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Methode	13
VI Problemstellung	15
VII Probanden	16
VIII Methode	16
1.) Testprinzip	16
2.) Substrate, Enzyme und Lösungen	16
3.) Angaben zur Galaktose-1-Phosphat-Uri- dyltransferase	19
4.) Herstellung des Hämolysats	21
5.) Aufbewahrung und Haltbarkeit	21
6.) Testansatz zur Aktivitätsbestimmung der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase	22
7.) Ausführung	22
8.) Berechnung	22
IX Ergebnisse	25
1.) Zur Entwicklung der Methode	25
2.) Zur Bestimmung der Aktivität der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase	34
X Diskussion	38
XI Zusammenfassung	44
XII Literaturverzeichnis	46

Benutzte Abkürzungen

G-1-P	Glukose-1-Phosphat
G-6-P	Glukose-6-Phosphat
G-1,6-P ₂	Glukose-1,6-diPhosphat
6-PGS	6-Phosphogluconsäure
Gal	Galaktose
Gal-1-P	Galaktose-1-Phosphat
PP	Pyrophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
NADP	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NADPH	reduzierte Form des NADP
UDPG	Uridindiphosphoglukose
UDPGal	Uridindiphosphogalaktose
UTP	Uridintriphosphat
Gal-Kinase	Galaktokinase
PGM	Phosphoglukomutase
G-6-PDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
Gal-1-PUT	Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase
ACD	acid citrate dextrose
EDTA	Äthylendiamin-tetraAcetat

I. Einleitung

Galaktose ist als Bestandteil des Milchzuckers ein Hauptnahrungsmittel des normal ernährten Säuglings. Dieses Monosaccharid wird durch enzymatische Umwandlung über Galaktose-1-Phosphat und Glukose in den Energie- und Baustoffwechsel eingeschleust. Bei intakter Aktivität der Enzyme akkumulieren weder Galaktose noch Galaktose-1-Phosphat im Blut.

Bei zwei hereditären Stoffwechselanomalien wird die mit der Nahrung aufgenommene Galaktose nicht verwertet und wirkt infolge ihrer Akkumulation toxisch. Die hierdurch unter anderem gesetzten Intelligenzdefekte sind irreversibel.

Mit einer Galaktose-freien Diät kann eine erfolgreiche Therapie durchgeführt werden. Deshalb müssen diese beiden Stoffwechselstörungen frühzeitig diagnostiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wird eine biochemische Methode zur Diagnose beschrieben, die im Vergleich mit den bisher entwickelten sehr gut meßbare Werte auch mit normalen Spektrallinienphotometern ergibt und somit Eingang in die Routinelaboratorien finden kann.

Mit dieser Methode war es auch möglich, Normalwerte in den verschiedenen kindlichen Altersstufen zu ermitteln, die erst die Abgrenzung gegen pathologisch erniedrigte Enzymaktivitäten gestattet, bei denen die diätetische Therapie unverzüglich beginnen muß.

II. Galaktose-Stoffwechsel.

Bestandteil des Milchzuckers ist die Galaktose. Sie kann im Stoffwechsel nicht direkt als Energielieferant oder Ausgangspunkt für die Synthese von Galaktose-Derivaten (Laktose, Galaktolipide, Chondroitinsulfat) benutzt werden, sondern muß über Galaktose-1-Phosphat, Glukose-1-Phosphat in Glukose-6-Phosphat umgewandelt werden, um z.B. nach dem Embden-Meyerhof-Schema abgebaut werden zu können. Der Umbau erfolgt über folgende Schritte:

- 1.) $\text{Gal} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Gal-Kinase}} \text{Gal-1-P} + \text{ADP}$
- 2.) $\text{Gal-1-P} + \text{UDPG} \xrightarrow{\text{Gal-1-PUT}} \text{G-1-P} + \text{UDPGal}$
- 3.) $\text{G-1-P} \xrightarrow{\text{PGM}} \text{G-6-P}$

Daneben existiert ein quantitativ weniger wichtiger Schritt von Galaktose-1-Phosphat zu UDPGalaktose:

- 4.) $\text{Gal-1-P} + \text{UTP} \xrightarrow{\text{UDPGal-Pyro-phosphorylase}} \text{UDPGal} + \text{PP}$

Die Reaktion 5.) verwertet auch die unter 2.) entstandene UDPGalaktose:

- 5.) $\text{UDPGal} \xrightarrow[\text{Epimerase}]{\text{UDPGal-4-}} \text{UDPG}$

Die für den Galaktosestoffwechsel spezifischen Enzyme sind also:

A.) Galaktokinase:

sie phosphoryliert Galaktose zu Galaktose-1-Phosphat mit Hilfe von Adenosintriphosphat;

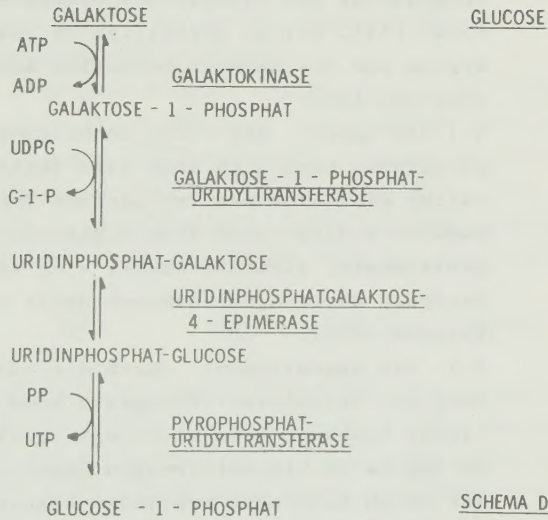
B.) Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase:

sie überträgt Uridindiphosphat von Glukose auf Galaktose, so daß Glukose-1-Phosphat und UDPGalaktose entstehen;

C.) UDPGalaktose-Pyrophosphorylase:

sie bildet aus Galaktose-1-Phosphat und Uridintriphosphat Pyrophosphat und UDPGalaktose.

L A K T O S E



SCHEMA DES

GALAKTOSEMETABOLISMUS

III. Galaktosämie.

Das Fehlen der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase ist die Ursache des Krankheitsbildes der Galaktosämie. Diese autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselkrankheit tritt mit einer Häufigkeit von 1 : 25 600 (2) bis 1 : 70 000 (12) auf.

Durch den Block im Galaktosemetabolismus kommt es zur Anhäufung von Galaktose-1-Phosphat, das durch Hemmung einiger für die Energieversorgung der Zellen wichtiger Enzyme wie z.B. Glukose-6-Phosphatase und Glukose-6-Dehydrogenase toxisch wirkt (31). Die am auffälligsten geschädigten Organe und die dadurch bedingten Krankheits-symptome sind:

- 1.) die Leber: aus einer Schädigung des Leberparenchyms kann sich über eine fettige Degeneration eine Zirrhose vom Laennec-Typ entwickeln. Dadurch bedingt sind eine Hepatomegalie, Hypoproteimämie, Aszites, Ödeme, eine hämorrhagische Diathese durch Hypoprothrombinämie und ein Ikterus (28);
- 2.) die Augenlinsen: durch die toxische Wirkung des Galaktose-1-Phosphats kann ein lösliches Linsenprotein nicht mehr gebildet werden, so daß es zu Linsentrübungen kommt und die Kinder durch Katarakte erblinden können (28);
- 3.) die Nieren: durch eine leichte Schädigung der Tubuli und ein perivaskuläres Ödem bedingt kommt es zur Hyperaminoazidurie (28).

Die Symptomatik der schweren Verlaufsform beginnt mit Ikterus prolongatus, Erbrechen und Diarrhoen. Durch die daraus resultierende Dehydratation, Hypotonie und Lethargie kommt es zu Gedeihstörungen des betroffenen Säuglings. Weiterhin ist eine geistige Retardierung auffällig, die neben den oben beschriebenen Ka-

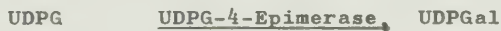
tarakten und der Hepatomegalie zu den Hauptsymptomen der Krankheit gerechnet wird.

Ferner können eine Hypergalaktosämie bei erniedrigtem Glukoseblutspiegel, eine Erhöhung des Galaktose-1-Phosphat-Gehaltes der Erythrozyten und eine Galaktosurie nachgewiesen werden.

Schwere Verlaufsformen der Krankheit können alle genannten Befunde aufweisen, abortive Formen fallen nur durch eine Abneigung gegen Milch auf.

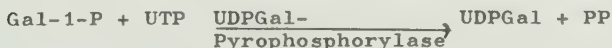
Die Diagnose wird durch den Nachweis der fehlenden Aktivität der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase gesichert.

Die Therapie besteht in Galaktose-freier Diät (12;13). Galaktose kann völlig durch Fruktose und Glukose ersetzt werden, die als Energielieferanten dienen. Galaktosederivate, wie zum Beispiel zerebrale Galaktolipide, können auch ohne Galaktosezufuhr über die Reaktion



synthetisiert werden. Diese Reaktion erklärt auch den Befund von Galaktose im Blut von Kindern, die eine Galaktose-freie Diät erhalten.

Mit zunehmendem Alter werden kleinere mit der Nahrung zugeführte Mengen von Galaktose toleriert. Diese klinische Beobachtung wird von Isselbacher durch eine physiologische Steigerung der Aktivität der UDPGalaktose-Pyrophosphorylase erklärt, durch die eine Galaktoseutilisation nach der Reaktion



möglich wird (17).

Alle Symptome der Galaktosämie, mit Ausnahme der geistigen Retardierung und schon vollständig ausgebildeter Katarakte, sind unter frühzeitig beginnender Diät rückbildungsfähig (10;15).

Da die Prognose galaktosämiekranker Kinder von einer vollkommenen Restriktion der Galaktose aus der Nahrung abhängt, sollte anhand der Bestimmung des Gehaltes der Erythrozyten an Galaktose-1-Phosphat die Durchführung der Diät kontrolliert werden. Therapiefehler in form unbeabsichtigter oder unbemerkter Galaktosezufuhr können an einem Anstieg des Galaktose-1-Phosphats, das normalerweise keine meßbaren Werte erreicht, erkannt werden (34).

IV. Galaktokinasemangel.

Der Galaktokinasemangel ist die zweite bisher bekannte, wahrscheinlich erbliche Krankheit im Galaktosemetabolismus mit einer vermuteten Häufigkeit von 1 : 40 000 (2).

Gitzelmann berichtet 1967 zum ersten Male über diesen Enzymdefekt bei zwei erwachsenen Geschwistern (11).

Thalhammer 1968 und Linneweh 1970 beschreiben die beiden ersten entdeckten Fälle bei Neugeborenen (32;23).

Danach ist der Galaktokinasemangel durch folgende Symptome gekennzeichnet:

erhöhter Galaktoseblutspiegel, Galaktosurie, Hepatosplenomegalie ab ca. 3.Lebenswoche (32), Linsentrübungen ab 4.-5.Lebenswoche (23), Katarakte bei Erwachsenen (11).

Intoxikationserscheinungen wie beim Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferasemangel, z.B. Erbrechen, Gewichtsverlust, Ikterus, Aminoacidurie oder geistige Retardierung konnten nicht festgestellt werden (11;23;32). Da sich aber bei Kindern aus Linsentrübungen mit zunehmendem Lebensalter Katarakte entwickeln können, sollte auch der Galaktokinasemangel frühzeitig erkannt und durch eine Galaktose-freie Diät therapiert werden. Die oben genannten Symptome sind auch hier -mit Ausnahme schon vollständig ausgebildeter Katarakte- unter dieser Therapie voll rückbildungsfähig (28).

V. Bisherige Methoden zur Bestimmung der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase.

Seit der Entdeckung der Galaktosämie sind verschiedene Methoden zur Bestimmung der Gal-1-PUT-Aktivität erarbeitet worden. Der erste Schritt war der

1.) Galaktose-Toleranztest, der schon bald nicht mehr angewendet wurde, da eine Galaktosebelastung betroffener Kinder zu viele Gefahren in sich birgt und zu einer Verschlechterung des Krankheitsbildes führen kann.

2.) Radioisotopen-Methoden.

Die genauesten Ergebnisse liefern Radioisotopen-Methoden, deren Durchführung allerdings an Speziallaboratorien gebunden ist und die daher als Suchtests keine Anwendung finden.

a.) Weinberg 1961 inkubierte Erythrozyten mit radioaktiv markierter Galaktose (^{14}C -Gal) und bestimmte die durch vollständige Galaktose-Oxydation entstehende Menge an $^{14}\text{CO}_2$ (53).

b.) Segal 1961 bestimmte die Menge von $^{14}\text{CO}_2$ in der Atemluft nach intravenös verabreichter ^{14}C -Gal (29).

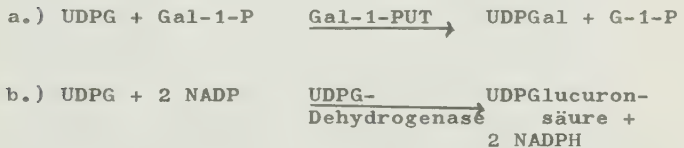
c.) Robinson beschrieb 1963 ein weiteres Prinzip (27): Hämolysat wird mit ^{14}C -Gal inkubiert, und anschließend werden die ^{14}C -Derivate chromatographiert und analysiert. So wurde nicht nur eine Unterscheidung zwischen Gesunden, Heterozygoten und Kranken möglich, sondern auch zwischen Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase- und Galaktokinase-mangel.

d.) 1968 wurde von Inouye (16) ein Test angegeben, in dem Erythrozytenhämolysate mit UDPG

und ^{14}C -Gal-1-P inkubiert werden. Die ^{14}C -Aktivität der UDPGal-Nucleotide ist ein Maß für die Aktivität der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase. Allerdings läßt sich mit dieser Versuchsanordnung kein Galaktokinasmangel erfassen.

3.) UDPG-Konsumptionstest.

Das Prinzip des UDPG-Konsumptionstestes geht auf Anderson et al 1957 zurück (1). In diesem Test werden Erythrozytenhämolysate mit UDPG und Gal-1-P inkubiert.



Dabei entstehen nach Reaktion a.) UDPGalaktose und Glukose-1-Phosphat, wobei UDPG verbraucht wird. Im zweiten Teil der Testanordnung wird die Menge des restlichen UDPG mit Hilfe der UDPG-Dehydrogenase bestimmt (Reaktion b.). Für jedes Mol UDPG, das nicht in Reaktion a.) eingegangen ist, entstehen zwei Mol NADPH, das spektrophotometrisch gemessen werden kann. Die Menge des verbrauchten UDPG ergibt sich rechnerisch aus der Differenz aus Gesamt-UDPG und gemessenem UDPG und ist ein Maß für die Aktivität der Gal-1-PUT.

Anderson et al. konnten selbst noch keine Unterscheidung zwischen Gesunden und heterozygoten Krankheitsüberträgern treffen, da die von ihnen gemessenen Aktivitäten von 2,5 - 3,5 $\mu\text{mol/h/g Hb}$ zu niedrig lagen. Außerdem stellte sich heraus, daß der Test unter den angegebenen Bedingungen nur schwierig reproduzierbar war.

Bretthauer et al. (6) beschrieben 1959 einen verbesserten UDPG-Konsumptionstest, dem das gleiche Prinzip zugrunde liegt, der sich aber durch günstigere Substratkonzentrationen vom ersten unterscheidet: die Konzentration von UDPG und Gal-1-P wird erhöht, weniger Hämoly-
sat zugesetzt und kürzere Zeit inkubiert. Dadurch wird die Unterscheidung zwischen Gesunden, Heterozygoten und Kranken möglich. Die Werte für die Aktivität der Gal-1-PUT liegen im Mittel für

Gesunde bei	6,14 μ mol/h/ml Hämolysat, für
Heterozygote bei	3,33 μ mol/h/ml Hämolysat, für
Kranke bei	0 μ mol/h/ml Hämolysat.

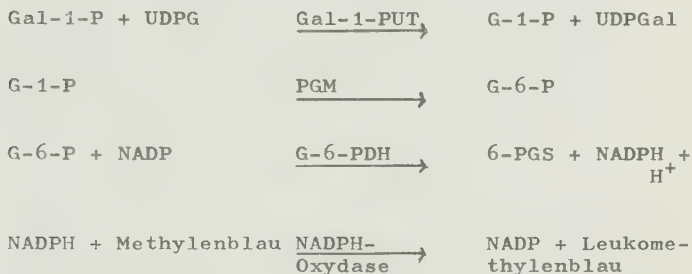
Da nach Beutler 1966 (3) die bisher beschriebenen Variationen des UDPG-Konsumptionstests ungenau sind und schwierig reproduzierbare Ergebnisse liefern, gibt er einen weiter verbesserten UDPG-Konsumptionstest an. Er ermittelte eine Michaeliskonstante der Gal-1-PUT für UDPG und bezog seine im Test eingesetzte Menge an UDPG auf die Michaeliskonstante. Außerdem wurden Korrekturfaktoren sowohl für nicht-spezifische Reduktion von NADP durch Verunreinigungen der UDPG-Dehydrogenase, als auch für Abweichungen von der Linearität angegeben.

4.) Methylenblau-Test.

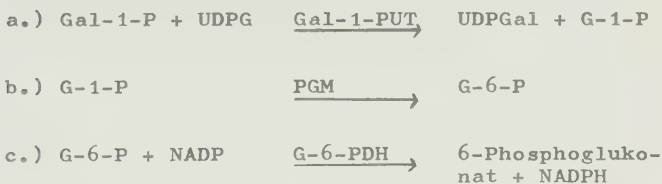
Bereits 1964 hatte Beutler einen Screening-Test veröffentlicht, der Methylenblau als Indikator benutzt (4).

Galaktose-1-Phosphat und UDPGlukose werden durch Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase in Glukose-1-Phosphat, anschließend Glukose-1-Phosphat durch Phosphoglukomutase in Glukose-6-Phosphat umgewandelt. Dieses Glukose-6-Phosphat wird von der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase oxidiert, gleichzeitig in der Testlösung vorhan-

denes NADP zu NADPH reduziert. Der nach Zusatz von NADPH-Oxydase frei werdende Wasserstoff entfärbt Methylenblau durch Reduktion.



5.) Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Methode.
Ein weiteres Prinzip der Bestimmung der Gal-1-PUT-Aktivität geht auf Kurahashi et al. 1958 zurück (22). Ursprünglich bestimmten diese Autoren mit einer von ihnen teilweise rein dargestellten Gal-1-PUT aus Kalbsleber Galaktose-1-Phosphat.



Sie setzten der Reaktionsmischung neben Glycinpuffer, Cystein-HCl, G-6-PDH, Phosphoglukomutase, MgCl_2 , NADP und UDPG das Gal-1-P in unterschiedlichen Konzentrationen zu und bestimmten durch Zugabe von Gal-1-PUT spektrophotometrisch die Menge an NADPH, die nach Reaktion c.) entsteht. Da jedes Mol NADPH einem Mol Gal-1-P entspricht, läßt sich der Gehalt an Gal-1-P errechnen.

Isselbacher griff dieses Prinzip auf und benutzte es zur Bestimmung der Gal-1-PUT-Aktivi-

tät (18). Der Reaktionsmischung wird Gal-1-P zugesetzt und die Gal-1-PUT-Aktivität in Erythrozytenhämolysaten bestimmt. Die Normalwerte liegen bei 0,16 - 0,67 U/g Hb.

Der 1970 von Kraus et al. (21) veröffentlichte Test unterscheidet sich vom oben genannten nur durch geringfügige Änderungen der Substratkonzentrationen und Enzymaktivitäten. Die von diesen Autoren gemessenen Aktivitäten der Gal-1-PUT liegen mit

$0,10 \pm 0,02$ U/g Hb bzw.

$3,3 \pm 0,7$ U/10¹² Erythrozyten niedriger als die von Isselbacher angegebenen Normalwerte.

Die mit den bisherigen Methoden gemessenen Aktivitäten der Gal-1-PUT liegen relativ niedrig. Durch eingehende Untersuchungen zur Methodik des Testes konnten wir günstigere Substratkonzentrationen finden. Durch Zusatz von G-1,6-P₂ als Co-Faktor der Phosphoglukomutase konnte eine weitere Erhöhung der Aktivität der Gal-1-PUT erzielt werden.

VI. Problemstellung

Seit Bekanntwerden der oben beschriebenen Defekte im Galaktosemetabolismus hat die Bestimmung der Aktivität der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase zunehmend Bedeutung erlangt. In dieser Arbeit wird ein einfacher Test mit gut reproduzierbaren Werten für die Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Aktivität angegeben, der nur etwa 2 ml Blut und ca. 10 Minuten Zeit benötigt. Außer einem normalen Spektrallinienphotometer sind keine besonderen Geräte notwendig. Diese Voraussetzungen dürften in den meisten Laboratorien erfüllt sein. Da mit unserer Testanordnung die Aktivitäten der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase gut meßbar waren, haben wir anhand von Reihenuntersuchungen bei Kindern verschiedener Altersstufen und Erwachsenen Normalwerte aufgestellt, deren Vergleich Rückschlüsse auf das Verhalten dieses Enzyms in verschiedenen Lebensaltern erlaubt.

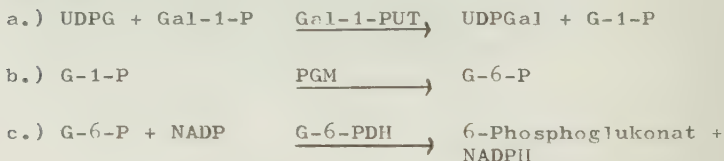
VII. Probanden.

Die Blutproben entstammen gesunden Neugeborenen der Marburger Universitätsfrauenklinik, klinisch gesunden Kleinkindern unserer Ambulanz bzw. eines Kinderheimes und gesundem Klinikpersonal. Außer einem kompletten hämatologischen Status wurden jeweils die BSG, Transaminosen, Elektrolyte, Harnstoff-N, Gesamt-Eiweiß und die Elektrophorese untersucht.

VIII. Methode.

1.) Testprinzip

Das von Isselbacher angegebene Testprinzip (18) wurde auch von uns verwandt, da das entstehende NADPH sofort die kontinuierliche Registrierung der Enzymkinetik gestattet.



Hierbei entspricht 1 Mol NADPH der Indikatorreaktion 1 Mol UDPGlukose der Meßreaktion. MgCl_2 wird als Co-Faktor der G-6-PDH, G-1,6- P_2 als Co-Faktor der Phosphoglukomutase der Testlösung zugesetzt.

2.) Substrate, Enzyme und Lösungen

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht besonders angegeben, von den Firmen E. Merck A.G., 61 Darmstadt oder Riedel de Haen, 3016 Hannover-Seeze,

alle biochemischen Reagenzien von der Firma
Boehringer & Söhne, 68 Mannheim, bezogen.

NADP: 33,6 mM: 25 mg di-Natriumsalz, MG 743,4,
Reinheitsgrad ca. 85 %, in 1 ml aqua
bidest. lösen;

UDPG: 35,3 mM: 20 mg di-Natriumsalz, MG 566,1,
Reinheitsgrad 83 %, in 1 ml aqua bi-
dest. lösen;

Gal-1-P: 93,8 mM: 40 mg di-Kaliumsalz, MG 426,4,
Reinheitsgrad ca. 58 %, in 1 ml aqua
bidest. lösen;

G-1,6-P₂: 2,26 mM: 2 mg tetra-Cyclohexylammonium-
salz, MG 808,4, Reinheitsgrad ca. 95 %,
in 1 ml aqua bidest. lösen;

MgCl₂: 0,1 M: 508,3 mg MgCl₂ x 6H₂O, MG 203,31,
in 25 ml aqua bidest. lösen;

PGM: 10 mg/ml Kristallsuspension, spezifische
Aktivität ca. 1000 U/ml;

G-6-PDH: 5 mg/ml Kristallsuspension, spezifische
Aktivität ca. 700 U/ml;

Gal-1-PUT: 5 mg lyophilisiertes Enzym in 1 ml aqua
bidest. lösen, spezifische Aktivität
ca. 5 U/ml;

Glycin-Puffer 0,1 M, pH 8,5
7,507 g Glycin, MG 75,07
5,844 g NaCl , MG 58,44
in 1 Liter aqua bidest. lösen.
4,00 g NaOH , MG 40,00
in 1 Liter aqua bidest. lösen.
93,5 ml Glycin/NaCl mit 6,5 ml NaOH 0,1 n
auf pH 8,5 einstellen.

Digitonin: 1 g Digitonin kristallisiert in 100 ml
aqua bidest. lösen;

ACD-Blutstabilisator:

22,0 g tri-Natriumcitrat- H_2O
7,3 g Zitronensäure, kristallwasserfrei
24,5 g Dextrose, 1 Mol Kristallwasser
aqua bidest. ad 1000 ml

0,9 prozentige, gepufferte Natriumchloridlösung, pH

18,0 g NaCl , MG 58,44
2,7 g $\text{Na}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, MG 177,99
4,9 g $\text{NaHPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, MG 137,99
in 2,22 Liter aqua bidest. lösen.

3.) Angaben zur Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (UDPGlukose: D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase, EC. 2.7.7.12)

Vorkommen:

Gal-1-PUT wurde nachgewiesen in:

Erythrozyten, Leber, Brustdrüse und Gehirn vieler Säugetiere (18), Galaktose-adaptierter Hefe und Galaktose-adaptierter E.coli, in menschlichen Erythrozyten und menschlicher Leber (22).

Kurahashi isolierte 1958 ein teilweise gereinigtes Enzym aus Kalbsleber (22). Nach seiner Methode enthält Gal-1-PUT noch UDPG-Pyrophosphorylase, PGM, Spuren von UDPG-4-Epimerase und Galaktokinase.

Die von Boehringer hergestellte Gal-1-PUT enthält an Fremdaktivitäten noch:

G-6-PDH max. 0,01 %; Phosphodiesterase 0,01 %; NADPH-Oxydase 0,1 %; Glukosedehydrogenase 1 % und UDPG-Pyro-Phosphorylase 5 %.

Haltbarkeit:

Gal-1-PUT ist bemerkenswert stabil. Nach Zusatz von ACD, Heparin oder EDTA zur Verhinderung der Gerinnung und Lagerung bei +4°C fand sich in vier Wochen kein nennenswerter Aktivitätsverlust (3). Die Aktivität in eingefrorenen Erythrozytenkonzentraten nimmt schneller ab, jedoch fanden Beutler et al. in zwei Tagen bei -4 bis -25°C keine nennenswerte Aktivitätsabnahme (3).

Die Firma Boehringer gibt für ihr lyophilisiertes, nicht gelöstes Präparat eine Haltbarkeit von 6 Monaten bei +4°C an.

Nach Isselbacher soll das zu untersuchende HämolySAT sofort hergestellt werden, das allerdings

bei -20°C mehrere Tage aufbewahrt werden kann (18).

Charakteristika:

Michaeliskonstante für UDPG	0,15 mmol	(4)
pH-Optimum	8,4 - 8,7	(3;22)
Co-Faktor	Mg^{2+}	(8)
Hemmung durch	Cl^{-}	(3)

4.) Herstellung des Hämolysats:

Frisch abgenommenes oder bei $+4^{\circ}\text{C}$ höchstens 6 Tage aufbewahrtes, heparinisiertes oder mit ACD abgenommenes Vollblut wird bei $+4^{\circ}\text{C}$ und ca. 1500 U/Minute 10 Minuten zentrifugiert, das Plasma und die oberste Erythrozytenschicht abpipettiert; dreimaliges Waschen des Erythrozytenkonzentrats mit kalter physiologischer Kochsalzlösung, Zählen der Erythrozyten (Einstellen auf ca. 8 Mill. Erythrozyten/ cm^3) und Bestimmung des Hämoglobingehaltes. Anschließend Hämolyse mit Digitonin, wobei das Erythrozytenkonzentrat 1 : 3 verdünnt wird:

1	ml	Erythrozytenkonzentrat
1	ml	Glycin-Puffer
0,8	ml	aqua bidest.
0,2	ml	Digitonin

schütteln, 20 Minuten bei $+4^{\circ}\text{C}$ stehen lassen, zentrifugieren 10 Minuten bei ca. 4000 U/Min., abpipettieren des Hämolysats.

5.) Aufbewahrung und Haltbarkeit:

Die Substrate werden täglich frisch gelöst. G-6-PDH und PGM in Originallösung können über Wochen verwandt werden.

Das Hämolysat sollte vor jedem Versuch frisch hergestellt werden; es zeigt bei $+4^{\circ}\text{C}$ für ca. 24 Stunden keinen Aktivitätsverlust der Gal-1-PUT.

6.) Testansatz zur Aktivitätsbestimmung der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase.

1,400 ml	Glycin-Puffer	0,1	M, pH 8,5	
0,180 ml	NADP	3,00	mM	(Konzentration in der Küvette)
0,100 ml	UDPG	1,80	mM	
0,150 ml	Gal-1-P	7,00	mM	"
0,010 ml	G-1,6-P ₂	11,00	μM	"
0,150 ml	MgCl ₂	7,32	mM	"
0,005 ml	PGM	2,5	U	"
0,005 ml	G-6-PDH	1,75	U	"
0,050 ml	Hämolystat			
2,050 ml	Gesamtvolumen			

$$v = 2,05 \text{ ml} \quad d = 1 \text{ cm} \quad 366 \text{ nm} \quad +25^{\circ}\text{C}$$

7.) Ausführung.

Substrate und Enzyme werden in der oben angegebenen Reihenfolge in die Küvette gegeben und in ein Photometer* gestellt. Abgelesen wird mit Filter Hg 366 bei einer Schichtdicke von 1 cm. Mit einem Kompensationsschreiber wird die Extinktionszunahme im Verhältnis zur Zeit graphisch registriert.

Hämolystat wird erst zugegeben, wenn nach ca. 2 Minuten alle unspezifischen Reaktionen beendet sind.

Angesetzt werden jeweils Doppelproben.

8.) Berechnung.

Die Berechnung kann nach folgender Formel erfolgen:

$$\frac{303 \times 4E/10' \times \text{Testvolumen} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{10 \text{ (Min.)} \times d \times \text{eingesetzter Extrakt}} = \frac{\text{mU}}{\text{Hämo}}$$

(d = Schichtdicke in cm)

* Firma Eppendorf-Gerätebau, 2 Hamburg

Der Faktor 303 ergibt sich aus folgender Überlegung: Die Enzymaktivität wird in internationalen Enzymeinheiten (IU) angegeben. Eine IU ist definiert als diejenige Enzymmenge, die pro Minute ein mikroMol Substrat umsetzt:

$$1 \text{ IU} = 1 \mu\text{Mol Substratumsatz/Min.}, \quad t = +25^{\circ}\text{C}$$

Der molare Extinktionskoeffizient von NADPH bei $+25^{\circ}\text{C}$ und einer Wellenlänge von 366nm beträgt:

$$3,3 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$$

Das heißt, daß ein Mol NADPH pro ml eine Extinktionsänderung von $3,3 \times 10^6$ ergibt:

$$1 \text{ Mol NADPH/ml} = \Delta E \ 3,3 \times 10^6$$

Daraus folgt:

$$1 \mu\text{Mol NADPH/ml} = \Delta E \ 3,3$$

Wenn die Extinktionsänderung von 3,3 in einer Minute zustande kommt, so ergibt sich:

$$\Delta E \ 3,3 = 1 \text{ U/ml}$$

$$\Delta E \ 1,0 = 303 \text{ mU/ml}$$

Die Berechnungsformel für unseren Test lautet dann:

$$\Delta E/10' \times \frac{0,303 \times 2,05 \times 3}{10' \times 1,0 \times 0,05 \text{ ml}} = \text{U/ml Hämolsat}$$

$$\Delta E/10' \times 3,72 = \text{U/ml Hämolsat}$$

$$\text{in } 1 \text{ mm}^3 = x \cdot 10^6 \text{ Erythrozyten}$$

$$\text{in } 1 \text{ ml} = x \cdot 10^9 \text{ Erythrozyten}$$

$$\Delta E/10' \times \frac{3,72}{\text{Erythrozyten in Mill.}} = \text{U}/10^9 \text{ Erythrozyten}$$

$$\Delta E/10' \times \frac{372}{\text{Erythrozyten in Mill.}} = \text{U}/10^{11} \text{ Erythrozyten}$$

Zum statistischen Vergleich zweier Versuchsgruppen bedienten wir uns der T-Verteilung nach Student.

Der Mittelwert M errechnet sich aus dem Quotienten aus der Summe der Einzelwerte und der Anzahl der Einzelwerte:

$$M = \frac{\sum a}{n}$$

Die Standardabweichung σ findet man nach der Formel:

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum x^2}{n-1}}$$

wobei x die Abweichung des Einzelwertes vom Mittelwert, n die Anzahl der Einzelwerte ist.

Des weiteren ermittelt man:

die Standardabweichung des Mittelwertes σ_M nach:

$$\sigma_M = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

die Standardabweichung der Mittelwertdifferenz

D zweier Mittelwerte nach:

$$\sigma_D = \pm \sqrt{\sigma_{M_1}^2 + \sigma_{M_2}^2}$$

die Zahl der Freiheitsgrade ν nach:

$$\nu = (n_1 + n_2) - 2$$

und den t -Wert nach:

$$t = \frac{D}{\sigma_D}$$

Den zu t gehörigen Wert liest man aus der Tabelle "Signifikanzschranken" der Student-Verteilung ab (9).

Zwei Gruppen sind signifikant unterschiedlich, wenn p nicht größer als 0,05 ist: $p \leq 0,05$.

Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse danke ich Herrn Dr. Himmelmann, Institut für Medizinische Statistik der Universität Marburg.

IX. Ergebnisse.

1.) Zur Entwicklung der Methode.

Um die Voraussetzungen für eine optimale Gestaltung des Testes festlegen zu können, testeten wir mit verschiedenen Hämolysatkonzentrationen, im Temperaturbereich zwischen $+10^{\circ}\text{C}$ und $+40^{\circ}\text{C}$ und bei pH-Werten im Bereich von pH 5,1 bis 10,2. Des weiteren ermittelten wir die günstigsten Substratkonzentrationen für UDPG, Gal-1-P und von NADP als Akzeptor der G-6-PDH-Reaktion, indem wir unterschiedliche Konzentrationen einsetzten. Dabei sollte die erzielte Extinktionszunahme pro Zeiteinheit möglichst groß, gleichzeitig die Substrat- bzw. NADP-Mengen möglichst gering sein, um auch die Kosten des Testes zu reduzieren. Zur weiteren Untersuchung der Methodik testeten wir mit und ohne G-1,6-P₂ als Co-Faktor der Phosphoglukomutase.

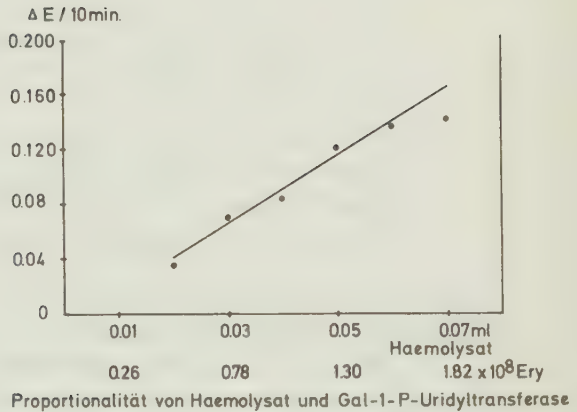
Alle Untersuchungen wurden jeweils mit verschiedenen Hämolysaten durchgeführt und ein jeweils typisches Beispiel (gelegentlich deren zwei) bildlich dargestellt.

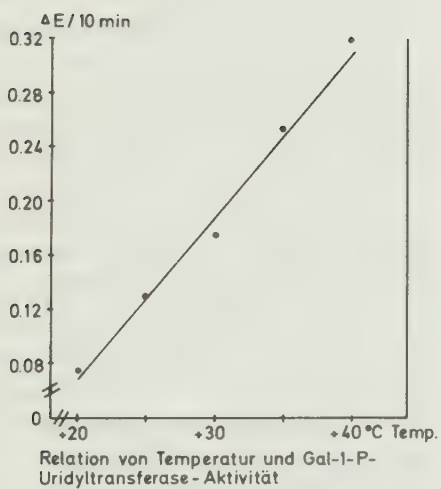
a.) In orientierenden Untersuchungen wurden zunächst verschiedene Puffer (TRAP, TRIS, Phosphat- und Hydrazin-Glykokollpuffer) verwandt, die jedoch alle geringere Aktivitäten als der dann eingesetzte Glycin-Puffer ergaben.

b.) Wir setzten Hämolysatmengen von 0,02 ml bis 0,07 ml ein, im dargestellten Fall entsprechend einer Erythrozytenzahl von $0,52 \times 10^8$ bis $1,82 \times 10^8$ (Abbildung 1).

Dabei stellten wir fest, daß die Extinktionszunahme pro Zeiteinheit linear mit der Ery-

throzytenzahl ansteigt. Mehr als 0,07 ml Hämolysat bzw. $1,82 \times 10^8$ Erythrozyten konnten mit dem Eppendorf-Photometer wegen der Eigenextinktion des Hämolysats nicht durchstrahlt werden. Erythrozytenzahlen von $0,8 \times 10^8$ bis $1,5 \times 10^8$, am besten in einer eingesetzten Menge von 0,05 ml, ergeben ein gut meßbares ΔE .





c.) Unter sonst gleichbleibenden Testbedingungen führten wir Versuche im Temperaturbereich von $+10^{\circ}\text{C}$ bis $+40^{\circ}\text{C}$ durch (Abb.2). Dabei stellte sich heraus, daß schon geringe Temperaturschwankungen deutliche Auswirkung auf die Aktivität der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase haben.

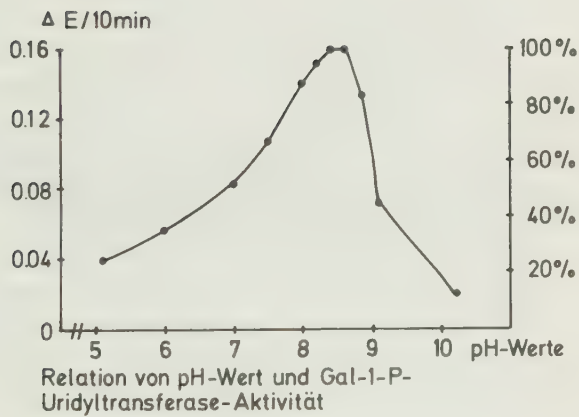
In diesem Temperaturbereich ergab sich eine lineare Abhängigkeit zwischen der Temperatur und dem ΔE . Das bedeutet, daß zumindest in diesem Bereich die Temperatur beliebig gewählt werden kann. Da sich internationale Angaben von Enzymeinheiten auf $+25^{\circ}\text{C}$ beziehen, führten wir unsere Untersuchungen bei dieser Temperatur durch.

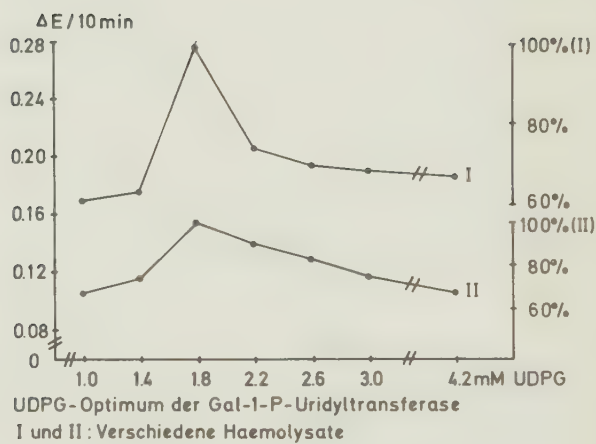
d.) Zur Ermittlung des optimalen pH-Bereiches stellten wir Puffer verschiedener pH-Werte zwischen pH 5,1 und 10,2 her (Abb.3).

Die graphische Darstellung zeigte eine Kurve mit deutlicher Aktivitätszunahme von pH 6,0 bis pH 8,4, ein Maximum bei pH 8,4 bis pH 8,6 (=100 %) mit einem folgenden steilen Abfall auf unter 20 % bei pH 10,2. Das heißt, daß die Gal-1-PUT bei einem pH 8,4 bis 8,6 ihre größte Aktivität besitzt und daß außerhalb dieses Bereiches mit einem steilen Aktivitätsabfall gerechnet werden muß. Da die pH-Kurve einen schmalen Gipfel hat, haben Ungenauigkeiten bei der Herstellung des Puffers deutliche Auswirkungen auf die Meßergebnisse.

e.) Wir fanden diejenige UDPG-Konzentration, die eine optimale Aktivitätsentwicklung der Gal-1-PUT erlaubt, indem wir eine Testreihe mit steigenden Konzentrationen an UDPG durchführten. Wir setzten dem Testansatz Mengen von 1,0 mM bis 4,2 mM zu (Abb.4).

Bei graphischer Auswertung ergab sich ein flacher Gipfel im Konzentrationsbereich um 1,8 mM. Erst bei 1,0 bzw. 4,2 mM war die Aktivität auf ca. 60 - 70 % abgefallen.





f.) Von Gal-1-P als zweitem Substrat der Gal-1-PUT stellten wir eine 93,8 mM Stammlösung her und setzten dem Testansatz steigende Volumina dieser Lösung zu, entsprechend Gal-1-P-Mengen von 1,375 mM bis 13,75 mM.

Mit steigender Substratkonzentration bis 4,58 mM fanden wir einen Aktivitätsanstieg um 30 %. Oberhalb von 4,58 mM war durch weitere Erhöhung der Gal-1-P-Konzentration keine Aktivitätssteigerung mehr festzustellen, so daß wir uns für einen Testansatz mit 7,0 mM entschieden.

g.) Die optimale Konzentration von NADP ermittelten wir durch graphische Auswertung der Versuche mit unterschiedlichen NADP-Konzentrationen (Abb.5).

Bei Auftragung des ΔE gegen die Substratkonzentrationen ergab sich schon ab 1,5 mM kaum noch eine Aktivitätssteigerung. Das heißt, daß oberhalb dieser Konzentration die Reaktionsgeschwindigkeit durch Erhöhung der Substratkonzentration nur noch minimal gesteigert werden kann. Unsere im Test verwendete NADP-Konzentration von 3,0 mM stellt das Optimum dar. Unterhalb von 1 mM NADP fällt die Aktivität steil ab.

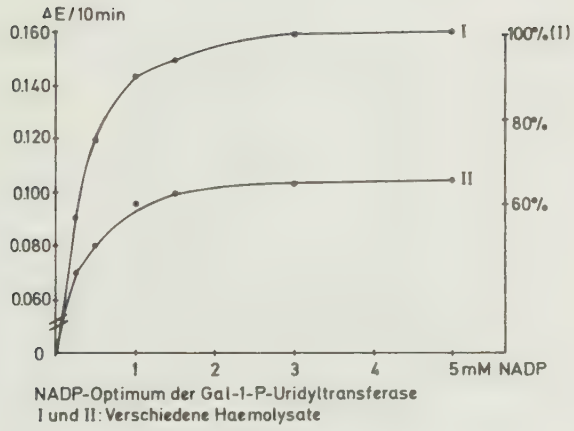
h.) G-1,6-P₂ setzten wir unserm Testansatz zu, nachdem wir in einer Testreihe die Aktivitäten der Gal-1-PUT mit und ohne G-1,6-P₂ verglichen hatten.

n=17	mit G-1,6-P ₂	und ohne G-1,6-P ₂
1	4,87	3,65
2	4,38	3,78
3	3,69	3,28
4	4,25	3,41
5	4,84	3,60
6	4,79	3,54
7	4,61	3,68
8	3,44	2,94
9	3,32	3,09
10	5,05	3,07
11	5,15	4,08
12	3,29	2,92
13	3,51	2,58
14	3,53	2,36
15	4,84	4,84
16	3,72	2,87
17	5,10	3,70
Mittelwert	4,26	3,37
Varianz	0,487	0,355
Standardabweichung	± 0,7	± 0,6

Tabelle I

Gal-1-Phosphat-Uridyltransferase-Aktivitäten bei Erwachsenen mit und ohne G-1,6-P₂; t = +25°C

Die statistische Auswertung zeigte, daß mit G-1,6-P₂ als Co-Faktor der Phosphoglukomutase die Aktivität der Gal-1-PUT signifikant verbessert wird.



2.) Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase.

a.) Wir untersuchten 10 Proben von Nabelschnurblut und fanden einen Mittelwert von 5,02 IU/10¹¹ Erythrozyten ($\pm$ 0,48) mit einer Varianz von 0,232 .

n=10	IU/10 ¹¹ Erythrozyten
1	5,71
2	5,05
3	4,88
4	4,65
5	5,27
6	5,43
7	4,70
8	5,01
9	5,42
10	4,04
Mittelwert	5,02
Varianz	0,232
Standardabweichung	$\pm$ 0,48

Tabelle II.

Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Aktivitäten in Nabelschnurblut; t = +25°C

b.) 13 Neugeborene zeigten im Mittel eine Gal-1-PUT-Aktivität von $4,96 \text{ IU}/10^{11}$ Erythrozyten ($\pm 0,85$) mit einer Varianz von $0,722$.

n=13	IU/ 10^{11} Erythrozyten
1	4,10
2	4,86
3	4,92
4	6,74
5	5,30
6	4,96
7	4,76
8	4,04
9	3,50
10	5,76
11	4,66
12	4,92
13	5,90
Mittelwert	4,96
Varianz	0,722
Standardabweichung	$\pm 0,85$

Tabelle III.

Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Aktivitäten bei Neugeborenen; $t = +25^{\circ}\text{C}$

c.) Die Untersuchung von 11 Kleinkindern ergab einen Mittelwert der Gal-1-PUT-Aktivität von $4,84 \text{ IU}/10^{11}$ Erythrozyten ($\pm 1,1$) mit einer Varianz von 1,222 .

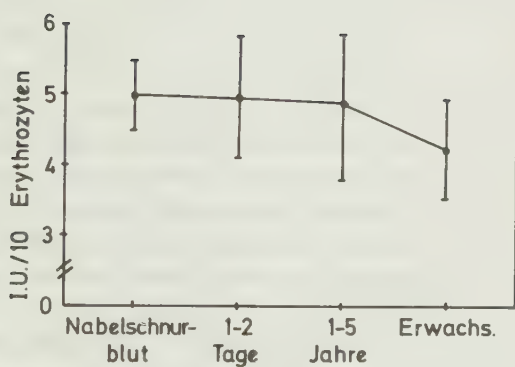
n=11	IU/ 10^{11} Erythrozyten
1	4,18
2	5,86
3	5,26
4	3,64
5	6,40
6	5,78
7	3,60
8	5,32
9	3,84
10	3,44
11	5,88
Mittelwert	4,84
Varianz	1,222
Standardabweichung	$\pm 1,1$

Tabelle IV.

Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Aktivitäten bei Kleinkindern; $t = +25^{\circ}\text{C}$

d.) Die Werte von 17 Erwachsenen wurden schon in der Tabelle I mit einem Mittelwert von $4,26 \text{ IU}/10^{11}$ Erythrozyten ($\pm 0,7$) mit einer Varianz von 0,487 angegeben.

e.) In Abbildung 6 ist der Verlauf der Mittelwerte der verschiedenen Altersgruppen noch einmal graphisch dargestellt. Von der Geburt bis zum Erwachsenenalter findet sich ein mäßiger Aktivitätsabfall, wobei jedoch nur die Nabelschnur- und die Erwachsenenwerte sich statistisch signifikant unterscheiden ($p \leq 0,05$).



Gal-1-P-Uridyltransferase-Aktivität in verschiedenen Altersgruppen

X. Diskussion

Dem Säugling wird mit der Nahrung auch Laktose angeboten. Etwa 7,1 g% Laktose sind in der Muttermilch enthalten (9), so daß 100 ml Milch ca. 3,5 g Galaktose enthalten.

Bei einigen Stoffwechselkrankheiten, die die Absorption oder die Spaltung der Laktose bzw. den weiteren Um- und Abbau ihrer Monosaccharide unmöglich machen, muß auf Laktose als wichtigen Nährstoff für den Säugling verzichtet werden.

1.) Laktasemangel (7;14): wenn von der Dünndarmmukosa keine Laktase gebildet wird, sammelt sich ungespaltene Laktose im Dünndarm an. Diese Laktose wirkt reizend auf die Darmschleimhaut und verursacht Hypermotilität. Sowohl durch osmotische Wirkung als auch durch die von Bakterien bewirkte Fermentation kommt es zu Durchfällen.

2.) Glukose-Galaktose-Malabsorption: das gleiche Bild sieht man bei der Glukose-Galaktose-Malabsorption, bei der der Transportmechanismus (carrier) mangelhaft ist und deshalb diese beiden Zucker nicht resorbiert werden (24).

Die Folge beider Defekte ist eine Malnutrition des betroffenen Kindes. Auf Laktose- bzw. Glukose-Galaktose-freie Diät sprechen die Kinder sofort an, indem die Durchfälle verschwinden und die Kinder an Gewicht zunehmen.

3.) Anders liegen die Verhältnisse bei der Galaktosämie. Wird der Urin galaktosämischer Kinder nicht auf reduzierende Substanzen untersucht und werden ein leichter Ikterus und eine geringe Hepatosplenomegalie übersehen, so entsteht der Verdacht auf diese Krankheit erst beim Auftreten von Katarakten.

Zu diesem Zeitpunkt können schon irreversible zerebrale Schäden bestehen.

Werden also reduzierende Substanzen im Urin von Säuglingen gefunden, so müssen diese umgehend identifiziert werden. Findet sich Galaktose, so muß die Diagnose durch die Bestimmung der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase gesichert werden.

4.) Ähnliche Probleme stellen sich beim Galaktokinase-mangel, der weniger dramatisch beginnt, aber wegen der langsam sich entwickelnden irreversiblen Schäden früh diagnostiziert und therapiert werden sollte.

Die Diagnose und Kontrolle der diätetischen Therapie der Galaktosämie als Folge des Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Mangels erfordern empfindliche und genaue Methoden zur Bestimmung der Enzymaktivität. Dies umso mehr, als außerdem noch eine Variante (Duarte) dieses Enzyms bekannt ist, die 50 % der normalen Aktivität der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase aufweist (2). Für die Entdeckung dieser Variante und der Überträger ist die Empfindlichkeit der Methode besonders wichtig.

Da bei Patienten mit Galaktosämie die Galaktokinase-Reaktion intakt ist, findet bei Anwesenheit von ATP die Phosphorylierung von Galaktose zu Galaktose-1-Phosphat statt. An dieser Stelle ist der Galaktosemetabolismus blockiert, so daß bei dieser Krankheit das Galaktose-1-Phosphat im Blut akkumuliert. Deshalb ist auch die Bestimmung des Galaktose-1-Phosphat im Blut für die Diagnose und die Therapie wichtig. Außerdem ermöglicht sie die Differenzierung gegenüber dem Galaktokinase-mangel, da in diesem Falle Galaktose anstelle von Gal-1-P akkumuliert.

Da der Säugling mit Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Mangel durch die toxische Wirkung des Gal-1-P gleich zu Beginn der Ernährung mit Muttermilch oder Kuhmilch geschädigt wird, empfiehlt es sich, sofort nach der Geburt Suchtests durchzuführen, die den Enzymmangel aufdecken können.

Einige der bisher entwickelten Methoden zur Bestimmung der Aktivität der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase erlauben zwar sowohl die exakte Diagnose als auch die Entdeckung der Heterozygoten (3;16), erfordern aber Inkubation, Eiweißfällung und anschließende enzymatische Bestimmungen (1;6;3;5) bzw. teure und zeitraubende Radioisotopenuntersuchungen (16;27;29;33;).

Leichter durchzuführende Methoden wie die Bestimmung mit G-6-PDH (18;21), die nur einfache Geräte erfordern und schnell durchführbar sind, hatten bisher den Nachteil, daß die gemessenen Enzymaktivitäten an der unteren Grenze der Norm liegen.

Nach der Methode von Isselbacher (18) liegen die Normalwerte bei etwa 0,16 - 0,67 U/g Hb. Bei einem Hämoglobinwert von 16 g% und einer Erythrozytenzahl von 5×10^6 in 1 mm^3 entspricht das Werten von 0,5 - 2,1 IU/ 10^{11} Erythrozyten.

Mit der Methode von Kraus (21) nach demselben Testprinzip werden z.B. für Erwachsene Enzymaktivitäten von 0,33 $\pm$ 0,7 U/ 10^{11} Erythrozyten gemessen. Die Registrierung so niedriger Enzymaktivitäten muß bei einem Spektrallinienphotometer mit mindestens vierfacher Extinktionspreizung vorgenommen werden und gestattet selbst dann nicht immer die Abgrenzung gegenüber lediglich unspezifischen Reaktionen. Nach unse-

ren Erfahrungen lassen sich selbst unter Aus-
nutzung aller technischer Möglichkeiten erst
Werte ab $2 \text{ IU}/10^{11}$ Erythrozyten sicher messen.

Autor		Aktivität	$\text{IU}/10^{11} \text{ Ery.}$
Anderson(1)	1957	$2,5 - 3,5 \mu\text{mol/h/g Hb}$	$0,13-0,19 +37^{\circ}\text{C}$
Bretthauer(6)	1959	$14,7 - 25,4 \mu\text{mol/h/g Hb}$	$0,78-1,33 +37^{\circ}\text{C}$
Beutler(3)	1966	$18,5 - 28,5 \text{ U/h/g Hb}$	$0,98-1,52 +37^{\circ}\text{C}$
Inouye(16)	1968	$19,8 \mu\text{mol/h/g Hb}$	$1,05 +37^{\circ}\text{C}$
Isselbacher(18)	1970	$0,16-0,67 \text{ IU/g Hb}$	$0,51-2,14 +25^{\circ}\text{C}$
Kraus(21)	1970		$0,33^{\pm}0,07 +25^{\circ}\text{C}$

Tabelle V

Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Aktivitäten
anderer Autoren.

(Die Umrechnung in $\text{IU}/10^{11}$ Erythrozyten erfolgte
nach der Annahme, daß in 100 ml Blut 16 g Hb ent-
halten sind und auf 1 mm^3 Blut 5×10^6 Erythrozyten
gezählt werden.)

Wir registrieren mit unserem verbesserten Test nach dem Prinzip, das auch Isselbacher (18) und Kraus (21) anwenden, die bisher höchsten Enzymaktivitäten von 4,26 ($\pm 0,7$) IU/10¹¹ Erythrozyten bei Erwachsenen bis zu 5,02 ($\pm 0,5$) IU/10¹¹ Erythrozyten in Nabelschnurblut.

Die von uns am höchsten gemessenen Aktivitäten der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase zeigen, daß wir das Testprinzip, das von Kurahashi (22) ursprünglich zur Bestimmung von Galaktose-1-Phosphat verwendet wurde, durch unsere Untersuchungen zur Methodik weiter verbessern konnten.

Wir verwenden so hohe Enzym- und Substratkonzentrationen, daß der Reaktionsablauf nur durch die Aktivität des zu untersuchenden Enzyms limitiert wird. Durch unsere Versuche schlossen wir die Möglichkeit einer Enzymhemmung durch zu hohe Substratkonzentrationen aus, indem wir Testreihen mit zwei- bis dreimal höheren als im Test verwendeten Mengen durchführten. Auch bei diesen hohen Konzentrationen war keine Enzymhemmung festzustellen. Höhere als die von uns vorgeschlagenen Substrat- und Enzymkonzentrationen verteuern daher lediglich den Test, ohne zu einer weiteren Erhöhung der Enzymaktivitäten zu führen.

Auf Glukose-1,6-P₂ als Co-Faktor der Phosphoglukomutase sollte nicht verzichtet werden, da unsere vergleichenden Untersuchungen eine signifikante Verbesserung der Versuchsergebnisse ergab.

Durch unsere Untersuchungen der Aktivität der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase aus Nabelschnurblut und Blut von Säuglingen, Kleinkindern und Erwachsenen konnten wir Normalwerte für diese Altersgruppen aufstellen.

Ein Vergleich der Normalwerte ergab nur zwischen Nabelschnurblut und Erwachsenen signifikante

Unterschiede, wobei im Nabelschnurblut die höchsten Werte gemessen wurden. Da Erythrozyten von Neugeborenen Galaktose aber schneller verwerten als die von Erwachsenen, darf man annehmen, daß der erhöhte Verbrauch an Galaktose allein auf die bei Milch-ernährten Kindern gesteigerte Aktivität der Laktase und der Galaktokinase zurückzuführen ist.

Nach Ng ist die Galaktokinaseaktivität bei Kindern etwa dreimal so hoch wie beim Erwachsenen (26;30). Bei Laktase und Galaktokinase ist also deutlich zu sehen, daß hier die Enzymaktivitäten durch Milchernährung induziert werden. Unsere Untersuchungen gaben keinen Hinweis auf eine Enzyminduktion auch der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase durch Milchernährung. Daraus darf geschlossen werden, daß eine größere Galaktose-Utilisation allein durch Erhöhung der Aktivität der Galaktokinase zustande kommt. Dieses Enzym scheint demnach der Schrittmacher im Galaktosemetabolismus zu sein.

XI. Zusammenfassung.

Die vorliegende Arbeit beschreibt eingangs den Galaktosemetabolismus. Danach wird anhand von Literaturstudien eine zusammenfassende Übersicht über die bisher bekannten Stoffwechseldefekte dieses Monosaccharids gegeben, einschließlich einer Beschreibung biochemischer Methoden zur Sicherung der Diagnose.

Wir stellen einen verbesserten enzymatischen Test zur Diagnose der Galaktosämie vor, der die Registrierung der bisher höchsten Meßergebnisse in der Bestimmung der Aktivität der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase in Erythrozyten ermöglicht.

Die Werte für die einzelnen Altersgruppen betragen:

im Nabelschnurblut	$5,02 \pm 0,48$	IU/10 ¹¹ Erythrozyten
bei Neugeborenen	$4,06 \pm 0,85$	IU/10 ¹¹ Erythrozyten
bei Kleinkindern	$4,84 \pm 1,10$	IU/10 ¹¹ Erythrozyten
bei Erwachsenen	$4,26 \pm 0,70$	IU/10 ¹¹ Erythrozyten

Statistisch signifikante Unterschiede bestehen nur zwischen den Nabelschnurblut- und Erwachsenenwerten ($p \leq 0,05$).

In vielfältigen Experimenten wurden der beste Puffer (Glycin), der optimale pH-Wert (8,5), die Substratoptima für UDPG (1,8 mM), für Gal-1-P (7,0 mM) und der katalytische Zusatz von Glukose-1,6-diPhosphat (11,0 μ M) ermittelt, sowie die Temperaturabhängigkeit überprüft.

Damit können, gegenüber den bisherigen Literaturangaben, 4- bis 10-fach höhere Enzymaktivitäten gemessen werden. Der Test ist ohne besonderen Aufwand in jedem Routinelabor durchführbar.

Der statistische Vergleich der Enzymaktivitäten verschiedener Altersgruppen legt ferner

die Vermutung nahe, daß nicht die Galaktose-1-
-Phosphat-Uridyltransferase, sondern die Galak-
tokinase das Schrittmacherenzym im Galaktose-
metabolismus ist.

XII. Literaturverzeichnis

- 1.) Anderson, E.P., H.M. Kalckar, K. Kurahashi, K.J. Isselbacher
A specific enzymatic assay for the diagnosis of
congenital Galaktosemia
J. Lab. & Clin. Med. 50, 469 (1957)
- 2.) Beutler, E.
Hereditary disorders of erythrocyte metabolism
Verlag Grune & Stratton, New York, London, S. 66 (1968)
- 3.) Beutler, E., M.C. Baluda
Improved method for measuring Gal-1-P-Uridyltransferase-activity of erythrocytes
Clin. Chim. Acta 13, 369 (1966)
- 4.) Beutler, E., M.C. Baluda, G. Donnell
New method for the detection of Galaktosemia and
its carrier state
J. Lab. & Clin. Med. 64, 694 (1964)
- 5.) Beutler, E., M. Mitchell
New rapid method for the estimation of red cell
Gal-1-P-Uridyltransferase activity
J. Lab. & Clin. Med. 72, 527 (1968)
- 6.) Bretthauer, R.K., R.G. Hansen, G. Donnell, W.R. Bergren
A procedure for detecting carriers of Galaktosemia
Proc. Nat. Acad. Sc. 45, 328 (1959)
- 7.) Davidson, M., E.H. Sobel, M.M. Kugler, A. Prader
Intestinal laktase deficiency of presumed congenital
origin in two older children
Gastroenterologie 46, 46 (1966)
- 8.) Dixon, M., E.C. Webb
Enzymes
Longmans, Green and Co LTD, Second Edition 1964, S. 72

- 9.) Documenta Geigy
Wissenschaftliche Tabellen
J.R.Geigy A.G., Pharma, Basel (1968)
- 10.) Donnell, G.N., M.Collado, R.Koch
Growth and development of children with Galaktosemia
J.Pediatrics 58, 836 (1961)
- 11.) Gitzelmann, R.
Hereditary galaktokinase deficiency, a newly recognized
cause of juvenile cataracts
Pediat.Res. 1, 14 (1967)
- 12.) Holzel, A.
Galaktosemia
Mod.Probl.Paediat. 3, 359 (1957)
- 13.) Holzel, A.
Some aspects of Galaktosemia
Mod.Probl.Paediat. 4, 388 (1959)
- 14.) Holzel, A., V.Schwarz, K.W.Sutcliffe
Defective laktose absorption causing malnutrition
in infancy
Lancet 1, 1126 (1959)
- 15.) Hsia, D.Y.Y.
Inborn errors of carbohydrate metabolism
Diabetes 10, 260 (1961)
- 16.) Inouye, T., H.L.Nadler, D.Y.Hsia
Galaktose-1-Phosphat Uridyltransferase in red and
white blood cells
Clin.Chim.Acta 19, 169 (1968)
- 17.) Isselbacher, K.J.
Evidence of an accessory pathway of galaktose
metabolism in mammalian liver
Science 126, 652 (1957)

- 18.) Isselbacher, K.J.
Uridyl-Transferase
in: Bergmeyer, H.U., Methoden der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1970, 2. Aufl., S. 768
- 19.) Isselbacher, K.J.
Galaktosemia
in: Stanbury, J.B., J.B. Wyngaarden, D.S. Fredrickson
The metabolic basis of inherited disease
The Blackiston Division-McGraw-Hill Book Company
2. Edit., New York 1966, S. 208
- 20.) Kirkmann, H.W., E.S. Maxwell
Enzymatic estimation of erythrocytic Gal-1-P
J. Lab. & Clin. Med. 56, 161 (1960)
- 21.) Kraus, H., E. Mönch
Enzymatische Methoden zur Diagnose der Galaktosämie
und des Galaktokinase mangels
Klin. Wschr. 48, 437 (1970)
- 22.) Kurahashi, K., E.P. Anderson
Gal-1-P Uridyltransferase, its purification and application
Biochem. Biophys. Acta 29, 498 (1958)
- 23.) Linneweh, F., E. Schaumlöffel, M. Vetrella
Galaktokinase mangel bei einem Neugeborenen
Klin. Wschr. 48, 31 (1970)
- 24.) Meeuwisse, G.W., K. Melin
Glukose-Galaktose-malabsorption, a clinical study of six cases
Acta Paediat. Scand., 188, 3 (1969)
- 25.) Mellmann, W.J., T.A. Tedesco
An improved assay of erythrocyte and leucocyte Gal-1-P-Uridyltransferase: stabilisation of the

- enzyme by a thiol protective reagent
J.Lab.&Clin.Med. 66,980 (1965)
- 26.) Ng, W.G., G.N.Donnell, W.R.Bergren
Galaktokinase activity in human erythrocytes of
individuals at different ages
J.Lab.&Clin.Med. 66,115 (1965)
- 27.) Robinson, A.
The assay of Galaktokinase and Gal-1-P Uridyl-
transferase activity in human erythrocytes
J.Exper.Med. 118,359 (1963)
- 28.) Schreier, K.
Die angeborenen Stoffwechselanomalien
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1963, S.96
- 29.) Segal, St., A.Blair, Y.J.Topper
Oxidation of carbon-14-labeled Galaktose by
subjects with congenital Galaktosemia
Science 136, 150 (1962)
- 30.) Segal, St., H.Roth, D.Bertoli
Galaktose metabolism by rat liver tissue: in-
fluence of age
Science 142, 1311 (1963)
- 31.) Siburg, J.B., Jr.
The Enzymatic Lesions in Galactosemia
J.Clin. Invest. 39,929 (1957)
- 32.) Thalhammer, O., R.Gitzelmann, M.Panlitschko
Hypergalaktosemia and Galaktosuria due to
Galaktokinase deficiency in a newborn
Pediatrics 42, 441 (1968)
- 33.) Weinberg, A.N.
Detection of congenital Galaktosemia and the

carrier state using Gal-1-¹⁴C and blood cells
Metabolism 10, 728 (1961)

34.) Zöllner, N.

Galaktose-1-Phosphat

in: Bergmeyer, H.U., Methoden der enzymatischen
Analyse

Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1970, 2. Aufl., S. 125.

Für die freundliche Überlassung des Themas
möchte ich Herrn Prof.Dr.med.W.Barthelmai
meinen Dank aussprechen. Für seine Beratung
und Unterstützung danke ich Herrn Dr.med.
M.Vetrella.

Lebenslauf

Am 10.1.1946 wurde ich als Tochter des Arztes Dr. Karl Stümpel und seiner Ehefrau Ingeborg geb. Piehl in Dortmund-Hörde geboren.

Nach der Reifeprüfung am Geschwister-Scholl-Gymnasium in Lünen/Westfalen am 4.2.1965 immatrikulierte ich mich an der Wilhelms-Universität in Münster und begann im Sommersemester 1966 mit dem Medizinstudium.

Am 18.4.67 legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung ab und bestand am 19.9.68 die ärztliche Vorprüfung. Nach einem klinischen Semester in Münster setzte ich mein Studium an der Philipps-Universität Marburg fort.

Nachdem ich zwischenzeitlich chirurgische, gynäkologische und intern-medizinische Famulaturen abgeleistet hatte, bestand ich am 14.12.1971 an der Universität Marburg die ärztliche Prüfung.

Ab 1.3.1972 arbeite ich als Medizinalassistentin am Albertinen-Krankenhaus in Hamburg-Schnelsen, ab 1.11.1972 am Städtischen Krankenhaus in Hildesheim.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren
Professoren und Dozenten:

in Marburg:

Barthelmai, Beckmann, Berendes, Bommer, Buch-
holz, Dittrich, Dölle, Eschenbach, Friederich,
Hamelmann, Hardewig, Havemann, Heuser, Hort,
Jacob, Koranski, Korb, Kunz, Linneweh, Mann,
Pots, Reim, Rodeck, Schleyer, Schmid, Siegert,
Siess, Solcher, Straub, Strohmeyer, Voss, Wil-
lenbockel,

in Münster:

Backmann, Budecke, Bender, Bier, Caspers, Eich-
ner, Giese, Hauss, Hartnagel, Hellenthal, Hon-
komp, Kappler, Kappert, Lenz, Menges, Menkhaus,
Menne, Pieper, Reploh, Reim, Rensch, Schür-
meyer, Sunder-Platzmann, Schnering, Tiwisina.

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Marburg zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

"Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Aktivitäten der Erythrozyten in verschiedenen Lebensaltern auf der Grundlage eines verbesserten Enzymtests."

in der Universitätskinderklinik unter Leitung von Herrn Prof.Dr.med.W.Barthelmai und mit Unterstützung von Herrn Dr.med.M.Vetrella ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner anderen in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 16. 11 1978

Gisela Stümpel

